

Untersuchungen
über die Lipaseaktivität von
Fermentpräparaten

Gerda von Philipsborn

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. K. Zipf



UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE LIPASEAKTIVITÄT
VON FERMENTPRÄPARATEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Gerda von Philipsborn
aus Oberstdorf/Allg.

1958

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Zipf

Referent: Professor Dr. K. Zipf

Tag der Promotion: 25. Juli 1958

Meinen Eltern gewidmet !



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einleitung	1
1) Allgemeiner Teil	3
1.1) Zur Systematik der tierischen und pflanzlichen Lipasen	3
1.2) Vorkommen von Lipasen	3
1.3) Wirkung der Pankreaslipase	4
1.4) Bestimmungsmethoden für die Pankreaslipase	5
2) Eigene Untersuchungen	8
2.1) Untersuchte Präparate	8
2.2) Zur Methode	12
2.2.1) Bestimmung der Lipaseaktivität nach WILLSTÄTTER, WALDSCHMIDT-LEITZ und MEMMEN, modifiziert von VOGEL und LAEVERENZ	12
2.2.2) Bestimmung der Lipaseaktivität nach FIORE und NORD	14
3) Ergebnisse	15
3.1) der Bestimmung nach WILLSTÄTTER und Mitarbeiter	15
3.2) der Bestimmung nach FIORE und NORD	16
4) Besprechung	
4.1) der Ergebnisse	24
4.2) der Methoden	26
5) Zusammenfassung	27
Literaturverzeichnis	29

Einleitung

Wie bekannt, befinden sich eine große Anzahl von fettspal-
tenden Fermentpräparaten verschiedener Wirksamkeit im
Handel. Ihre Haltbarkeit ist erfahrungsgemäß begrenzt. Es
ist deshalb wünschenswert, die weniger guten von den guten
zu unterscheiden.

Dieses Ziel läßt sich durch klinische Prüfungen oder durch
Untersuchungen in vitro verfolgen.

Untersuchungen in vitro können von vielen Faktoren wesent-
lich beeinflußt werden, woraus die Gefahr unterschiedlicher
Ergebnisse resultiert. Sie zu verkleinern durch Bemühungen
um größere Zuverlässigkeit der Methoden darf als wichtige
Aufgabe bezeichnet werden.

Beiden Problemen - Unterscheidung der guten Präparate des
Handels von anderen und Prüfung einer neueren Methode durch
Vergleich mit der klassischen von Willstätter - ist in der
vorliegenden Arbeit nachgegangen worden.

1) Allgemeiner Teil

1.1) Zur Systematik der tierischen und pflanzlichen Lipasen

Die Lipase zählt zu der Gruppe der Esterasen. Sie sind Fermente, die den Auf- und Abbau von Estern katalysieren und werden den Hydrolasen zugeordnet.

Die Einteilung der Esterasen erfolgt nach den Substraten, auf die sie spezifisch wirken.

Die Substrate der Lipase stellen Ester aus ein- und mehrwertigen Alkoholen und organischen Säuren dar.

Ein Ferment ähnlicher Wirkung ist die Esterase im engeren Sinn, als "simple esterase" in der angelsächsischen Literatur bezeichnet. Sie wirkt auf dieselben Substrate wie die Lipase; beide Fermente unterscheiden sich jedoch insofern, als die Lipase die Ester der mehrwertigen, die Esterase jene der einwertigen Alkohole schneller spaltet. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer "sehr abgestuften relativen Spezifität" (9).

1.2) Vorkommen der Lipase

Das Vorkommen der tierischen Lipase erstreckt sich auf alle Organe des Körpers. Besonders viel Lipase findet man im Verdauungsapparat; hier unterscheidet man eine Magenlipase mit Wirkungsoptimum im sauren Milieu und eine Pankreas- und Darmlipase, die im alkalischen Milieu am besten wirken. Die Lipase der Organe ist an unlösliche Zellbestandteile verankert (Desmo-Lipase) und liegt nur zu etwa 1 % als Lyo-Lipase vor (9). - Im Blut kommen verschiedene Esterasen vor, wobei es sich im Serum und in den Erythrozyten anscheinend um Esterase im spezifischen Sinne, in den Leukozyten um Lipase handelt.

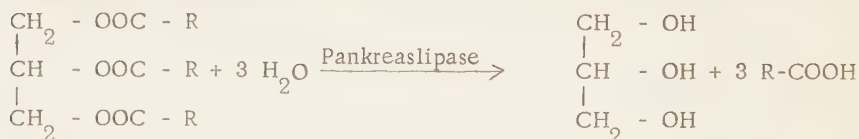
Lipasen der höheren Pflanzen, die Phytolipasen, kommen besonders in Samen vor (Raps, Senf, Mohn, Ricinus). Sie sind unlöslich und wirken im Gegensatz zur Pankreaslipase bei einem pH-Wert von 4,7 - 5,0; sie

spalten Fette besser als Ester einwertiger Alkohole.

Schließlich gibt es noch Esterasen der Schimmel- und Sproßpilze und der Bakterien, die teils wie spezifische Esterasen, teils wie Lipasen wirken.

1.3) Wirkung der Pankreaslipase

Die nach Willstätter (6) aus einem Agon (aktive Gruppe) und einem Pheron (substratspezifischer kolloidaler Träger) zu einem Symplex zusammengesetzte Pankreaslipase spaltet Fette in Glycerin und freie Fettsäuren:



Die Spaltungsgeschwindigkeit nimmt nach Toyoki (23) bei Glyceriden aus gesättigten Fettsäuren mit steigendem Molekulargewicht ab, während sie bei solchen aus ungesättigten Fettsäuren vom Molekulargewicht unabhängig ist.

Der Spaltungsvorgang kann von aktivierenden und hemmenden Begleitstoffen beeinflusst werden.

Als aktivierende Stoffe sind Gallensalze (Natriumglykocholat, Taurocholat), Kalziumsalze, gewisse Aminosäuren, Proteine, Gummi arabicum u. a. bekannt (9). Sie wirken im alkalischen Milieu.

Die in kolloidaler Form vorliegenden Aktivatoren adsorbieren nach Willstätter (27) Substrat und Enzym und beschleunigen auf diese Weise die Reaktion.

Kraut und Jurewicz (12) deuten die Aktivierung anders. Sie glauben, daß das Agon gegenüber dem Pheron im Überschuß vorhanden sei und der Aktivator an Stelle des Pherons als Ersatzträger fungieren würde.

Baman und Laeverenz (5) schreiben die unterschiedliche Aktivität des Enzyms nicht nur dem Einfluß von Begleitstoffen zu, sondern Unterschieden im Wirkungsvermögen der Lyo-Lipasen.

Eine Hemmung der Lipasewirkung kann durch verschiedene Stoffe erfolgen. So wirkt ein Teil der obengenannten Aktivatoren im sauren Milieu als Hemmstoffe.

Willstätter (27) hält den Hemmungsvorgang für eine Adsorption der Lipase an die Hemmstoffe.

1.4) Bestimmungsmethoden für die Pankreaslipase

Alkalimetrische Bestimmungen mit echten Fetten als Substrat

a) Methode nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz (27)

Die Autoren lassen das Enzym auf Olivenöl als Substrat einwirken, wobei als sogenannte "ausgleichende Aktivierung" (zur Unterdrückung des Einflusses von hemmenden Begleitstoffen) Kalziumchlorid- und Albuminlösung zugesetzt werden.

Nach einstündiger Verdauung bei 30 °C werden die freigesetzten Fettsäuren mit KOH gegen Thymolphthaleinlösung titrimetrisch ermittelt.

Der pH-Wert wird während der Enzymeinwirkung - im Gegensatz zu anderen Methoden - nicht konstant, sondern in dem optimalen Bereich zwischen 8,9 und 5,5 gehalten.

Willstätter definiert als Lipaseeinheit jene Enzymmenge, die unter bestimmten Bedingungen bei 30 °C in einer Stunde 24 % von 2,5 g Olivenöl der Verseifungszahl 185 spaltet.

b) Methode von Willstätter und Mitarbeiter nach dem Verfahren von Vogel und Laeverenz (26)

Vogel und Laeverenz modifizieren die Methode von Willstätter und Waldschmidt-Leitz insofern, als sie die Menge der Aktivatoren (Kalziumchlorid und Albuminlösung) vergrößern und das emulsionsfördernde Natriumoleat als weiteren Aktivator hinzufügen. Auf diese Weise soll der Einfluß verschiedener Reinheitsgrade des Enzyms auf die Umsatzgeschwindigkeit ausgeschaltet werden.

c) Methode von Fiore und Nord (8)

Fiore und Nord ersetzen die in den oben beschriebenen Methoden verwendeten Aktivatoren durch einen Polyvinylalkohol, der die Emulgierung

des Substrates übernimmt. Sie vermeiden auf diese Weise Nebenwirkungen, die sich nach Spaltung der Albuminlösung durch eventuell anwesende Proteasen als pH-Veränderung (in Richtung auf ein saures Milieu) und als schleppende Einstellung des Titrationsendpunktes darstellen.

d) Methode nach Balls und Mitarbeiter (1)

Das Substrat (0,005 Mol Olivenöl) wird mit getrockneter Rindergalle - in Glycerin gelöst - durch Erhitzen emulgiert. Es wird ein Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer (pH-Wert = 8,0), Kalziumchloridlösung als Aktivator, Phenolphthaleinlösung und die Enzymlösung zugegeben.

Nachdem der pH-Wert dieses Gemisches auf 8,5 eingestellt ist, erfolgt die Verdauung bei einer Temperatur von 40 °C.

Die nun auftretende Änderung des pH-Wertes (erkenntlich am Umschlag des Indikators) wird durch Zutropfen von 5 n-Ammoniaklösung laufend ausgeglichen.

Die Ermittlung des Leerwertes erfolgt in analoger Weise unmittelbar nach Zugabe der Fermentlösung.

Bestimmungen unter Verwendung wasserlöslicher Substrate

Die folgenden Methoden unterscheiden sich von den bereits genannten durch die Verwendung wasserlöslicher Substrate an Stelle echter Fette.

e) Alkalimetrische Methode nach Willstätter und Memmen (29)

Die Autoren verwenden Buttersäuremethylester als Substrat und lösen diesen in einem Gemisch von Wasser und Glycerin. Sie fügen Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, Natriumoleat und Kalziumchlorid (Aktivierung) und schließlich die Enzymprobe zu.

Nach einstündiger Verdauung bei 30 °C werden die in 20 ml des Verdauungsgemisches vorliegenden Fettsäuren mit 0,2 n-KOH gegen Bromkresolpurpur titriert. Der Leerwert wird zu Anfang der Hydrolyse in gleicher Weise ermittelt.

Willstätter und Memmen definieren im Zusammenhang mit ihrer Me-

thode eine Lipaseeinheit als jene Enzymmenge, die in 20 ml Verdauungsgemisch 25 % des Substrates spaltet.

f) Azidimetrische Mikromethode nach Glick (11)

Glick bestimmt die aus Methylbutyrat als Substrat abgespaltene Buttersäure azidimetrisch, indem er die Verminderung der Basenkonzentration eines Glykokoll-NaOH-Puffers pro Zeiteinheit als Maß für enzymatische Aktivität wertet.

g) Stalagmometrische Methode nach Willstätter und Memmen in Anlehnung an Rona und Michaelis (28)

Bei der Methode von Willstätter und Memmen dient die Veränderung der Oberflächenspannung von Tributyrin (Substrat) bei hydrolytischer Spaltung als Maß für die Lipaseaktivität. Die Autoren arbeiten mit "ausgleichen-der Aktivierung" (27) unter Benützung von Eialbumin- und Kalziumchloridlösung.

Sie bezeichnen als Butyraseeinheit die Enzymmenge, die unter den Bedingungen der Methode eine Abnahme von 20 Tropfen, das ist die Hälfte der Differenz zwischen der Tropfenzahl von reiner Tributyrinlösung und von reinem Wasser, bewirkt.

h) Colorimetrische Methode von Nachlas und Seligman (14 und 20)

Als Substrate finden β -Naphthylacetat, -laurat und -stearatpalmitat Verwendung. Aus ihnen wird durch die Enzymwirkung β -Naphthol freigesetzt, das mit tetrazotiertem Di-ortho-anisidin eine farbige Azoverbindung bildet. Die Farbe wird colorimetrisch bestimmt.

Auf diese Weise wird vorwiegend die Wirkung der Esterase im engeren Sinn erfaßt. Um auch Lipase bestimmen zu können, erhält das Substrat einen Taurocholatzusatz. Die Wirkungsdifferenz mit und ohne Zusatz wird der Lipase zugeschrieben.

i) Manometrische Methode von Rona und Lasnitzky (15)

Nach dieser Methode wird durch die aus Tributyrin (Substrat) abgespaltene

Fettsäure CO_2 aus einem Bikarbonatpuffer freigesetzt und manometrisch bestimmt.

Als weitere Bestimmungsmethoden sollen schließlich

k) eine nephelometrische Methode von Rona und Kleinmann (17)

l) eine dilatometrische Methode von Rona und Amon (19)

m) eine nephelometrische Methode von Sumner und Somers (22)

Erwähnung finden.

2) Eigene Untersuchungen

Mit zwei der aufgezählten Bestimmungsmethoden wurden eigene Untersuchungen auf den Lipasegehalt der folgenden Präparate durchgeführt:

2.1) Untersuchte Präparate:

<u>Handelsbezeichnung</u>	<u>Hersteller und Zusammensetzung</u> (aus der Roten Liste 1957)
1. Arbuz	Dr. Schwab, München 8 Aktiv. Papain 0,043 g, Pankreatin 0,016 g
2. Bilicombin	Dr. Brunnengräber, Lübeck, 1 Dragée enthält: Gallensäuren 0,08 g, Pankreatinkonzentrat 0,1 g (nach Willstätter: 9 Einh. Trypsin, 5 E Amylase, 3 Einh. Lipase) Atropinsulfat 0,00025 g, Papaverin 0,1 g.
3. Combizym	Luitpold-Werk, München Verdauungsferment mit gleichbleibendem Gehalt an Proteasen, Lipase, Amylase, Zellulasen und Hemizellulasen, stand. nach Willstätter und Grassmann.
4. Dymal	C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim Verdauungsfermente (Proteinasen, Amylasen, Esterasen, Cellulasen, Hemicellulasen) hergestellt aus Reinkulturen v. Aspergillusarten.

5. Encymapain "Jura" Jura-Chema K.G. Konstanz
 Aktiv. Papain-Fermentsystem, verstärkt durch
 Pankreasfermente, proteolytische Malz-Enzyme.
 1 g Encymapain Substanz enthält 60 Trypsin-
 einh., 4200 Baumanneinh., 32 Lipase-, 24
 Amylase-Einheiten.

6. Enzym-Grandelat Keindiät GmbH, Augsburg
 Pflanzl. Fermentpräparat enth. mindestens
 5000 γ Proteinasen, 75 Einh. (Smeth u. Roc)
 Amylasen, 0, 2 E. Lipasen und 0, 002 Oxydasen
 in Katalase-Einh. ausgedrückt.

7. Enzymo-Drageletten Arzneimittelwerk Fischer, Buhl/Baden
 Extr. Fel suis 0, 1 g; Pankreatin 0, 1 g; Ol. Menth.
 pip. 0, 0025 g; Ol. Carvi 0, 0025 g; Relaxol-
 Mischung 0, 05 g; Form d. Außenschicht anac:
 0, 1 g Pepsin; 0, 2 g Betainchlorhydrat; hyper:
 0, 2 g Magnesiumtrisilicat; neutr. 0, 1 g Pepsin.

8. Enzynorm Nordmark Werke, Hamburg
 Standard. biologisches Magenenzym-Präparat
 mit mucinegebundener Salzsäure und dem Intrinsic
 Factor.

9. Eufiat-Dragees Südmedica, GmbH, München
 Radix Angelicae, Papaverin 0, 02 g, Aloe,
 Pankreasextrakt und Gallenextrakt in Verbin-
 dung mit Kaffeekohle.

10. Eupept Ifah, GmbH. Hamburg
 1 Dragée: Magenextrakt (entsprechend 250 VE
 nach Groß), mucinegebundene Salzsäure, Pankrea-
 tin 25 mg, Galle 2 mg, Aloe 3 mg, Menthol
 5 mg, Phenyl-(1-piperidino-)essigsäure- β -dia-
 ethyl-amino-äthylester-dichlorhydrat 5 mg.

11. Fermocyl Vial & Uhlmann, Frankfurt
 Faex med. 88 %, Natr. phosphat 4 %
 Natr. glycerino-phosphat 4 %, Natr. bicarbon. 2%,
 Pankreatin 2 %.

12. Festal
 Farbwerke Hoechst, Frankfurt
 Enzympräparat mit säurefest. Überzug
 10 WILLST.E. Pankreas Lipase,
 10 WILLST.E. Pankreas-Amylase,
 15 WILLST.E. Trypsin, 50 mg Hemicellulosen, 25 mg Gallebestandteile.
13. Florohormon
 Dr. Sidler & Co., Freiburg i. Br.
 Preßmasse 56 %, Faex, Acid.citric.,
 Natr.sulf. $\bar{a}\bar{a}$ 5,4 %, Rhiz.Rhei 15 %, Pankreatin 1,5 %, Phenolphthalein 12 %.
14. Gedohepar
 Gedora-Arzneimittelfabrik,
 G. Hofele, Bad Godesberg
 Extr. aus Curcuma madr. 0,01 g,
 Chelidonium maj. 0,01 g, u. a.
 Natr.choleincum (Fel tauri) 0,09 g
 Pankreatin-Konzentrat 0,09 g.
15. Hevizym
 (nicht mehr im Handel, aus Rot. Liste 1954)
 Amol-Werk, V. Wachsmut, Hamburg
 Aktiv. Verd.fermente, besond. Amylase,
 Zellulase
16. Idoform
 Hor-Fer-Vit, Pharmazeut.Fabrik, Oldenburg
 50 mg Pankreatin, 1 mg Mucoprotein,
 25 mg Fel tauri sicc. u. a.
17. Intestiflor
 Dr. Hennig, Chem.pharmazeut.Werk, Berlin
 Pilz- und Pankreasfermente, 1 Drag.enth.
 850000 WOHLGEMUTH-Einh., 2 Lipase-Einh.,
 3 Amylase-Einh., 4 Trypsin Einh.
18. Intestinol
 Dr. Hennig, Berlin/Tempelhof
 Pankreasfermentpräp. 1 Drag. enth. 4 Lipase-,
 6 Amylase- und 8 Trypsin-Einh. 20 mg gall.
 saur.Salze, 5 mg Darmschleimhautextr. und
 75 mg Tierkohle.
19. Okipan
 Röhm & Haas GmbH., Darmstadt
 Extr.Pancreat.sicc. 0,05 g; Extr.Mycl.
 asperg. 0,05 g; Papain 0,05 g; Cystein.hydro-
 chlor. 0,002 g; Faex sicc. 0,073 g.

20. Okizym Röhrl & Haas, GmbH., Darmstadt
Extr. Mycel. asperg. 0,06; Papain 0,06 g;
Cystein hydrochlor. 0,002 g; Faex sicc. 0,103 g
pro Tablette.
21. Pancrazym N Röhrl & Haas, GmbH., Darmstadt
Extr. Pancreat, sicc. 0,125 g;
Faex sicc. 0,1 g pro Tablette.
22. Pancurmen Temmler-Werke, Hamburg-Neugraben.
Pankreas sicc. 0,25 g; Curcumin-Na 0,1 g;
Diastase (1:100) 0,1 g
23. Pankreasmellin-Neu Lab. Dr. K. v. Stockhausen, München
1 Tablette zu 0,3 g = 2,1 g frische Pankreasdrüse
24. Pankreatin-Dragee Dr. Chr. Brunnengräber, Lübeck
Pankreaspräparat mit 30 Trypsin-, 23 Amylase-
und 10 Lipase-Einh. nach WILLSTÄTTER pro
Dragee.
25. Pankreon Tabl. Kali-Chemie, Hannover
Pankreasfermentpräparat standard. auf 5 Lipase-,
18 Amylase- und 28 Trypsin-Einh. nach WILL-
STÄTTER je Tabl. bzw. Drag. Die Drag. ent-
hält. zusätzl. 50 mg Galledispert.
26. Pankreon Drag. Kali-Chemie, Hannover
27. Pankrodigest Sanabo, Wien XII
Pankr. fermentpräparat standard. auf Trypsin,
Amylase und Lipase.
28. Panpeptal Dr. Chr. Brunnengräber, Lübeck
1 Dragee enthält 11-12 DAB-Einh. Pepsin
8-10 Trypsin-, 4-5 Amylase- und 4-5 Lipase-
einh. nach WILLSTÄTTER
29. Pantozyme Dr. A. Wander AG, Bern
Amylase, Cellulase, Lipase, Pepsin, Proteasen,
Extr. faecis, Excip.
30. Panzynorm Nordmark-Werke, Hamburg
Pankreatin 0,100 g (Gehalt an Trypsin, Lipase,
Amylase standard. nach WILLSTÄTTER-KUNITZ);
Magenextr. 0,100 g; Fel tauri 0,050 g.

- | | |
|----------------|---|
| 31. Purgocit | Hor-Fer-Vit, Oldenburg
Fel tauri dep. sicc. 4 mg; Pankreas 5 mg u. a. |
| 32. Nematolyt | Heinrich Mack Nachf. Illertissen/Bayern
Aktiviertes Enzymsystem aus Carica papaya.
83,4 % (Plv.) bzw. 50 % (Granulat) u. a. |
| 33. Vermizym | Dr. Schwab, München
Papain, Carica-Fermente (pro Erwachs. Dr. 0,21 g,
pro Kinder Drag. 0,026 g Papain). |
| 34. Acrustin | "Atmos" Fritzsching & Co., Viernheim/Hess.
3,5 % Pepsin 1:1000; 1 % Papain 1:350 |
| 35. Nekrosolva | Kali-Chemie AG, Hannover,
Pankreasfermentpräparat (1 g Pankreatin und
0,5 g Fel tauri sicc. plv.) in Schleimform
(40 g Schleimansatz). |
| 36. Pyosolva | Kali-Chemie, Hannover
Lösung v. Pankr. ferment, eingestellt auf
180 Trypsin E. WILLST. /10 ml. |

2.2) Zur Methode

2.2.1) Bestimmung der Lipaseaktivität nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Memmen, modifiziert von Vogel und Laeverenz (26)

Prinzip:

Das auf Olivenöl (Substrat) einwirkende Enzym wird durch Kalziumchlorid, Eialbumin und Natriumoleat aktiviert und das entstandene Säureäquivalent mit Kalilauge gegen Thymolphthalein titriert.

Reagentien:

Wäßrige Suspension des Fermentpräparates

Olivenöl Verseifungszahl 190,7 (Olio Sasso: Sasso & Figli, Oneglia, Italien)

Ammoniak-Ammoniumchlorid-Puffer, pH-Wert = 8,9

(33 ml n-NH₃-Lösung + 67 ml n-NH₄Cl-Lösung)

- 2 %ige Kalziumchloridlösung
- 3 %ige Lösung aus getrockneten und pulverisiertem Eialbumin (Merck)
- 2 %ige Lösung von Natriumoleat (Riedel de Haen)
- 96 %iger Aethylalkohol
- Aether aethylicus
- 1 %ige alkoholische Thymolphthaleinlösung
- 0,5 n-methylalkoholische Kalilauge (Merck)

Bereitung der Fermentlösung:

3 Tabletten (Tabl.) oder Dragées (Drag.) eines Präparates werden mit Seesand zerrieben und ad 60 ml Aqua dest. suspendiert. Davon kommen 0,5 ml, 2,0 ml, 6,0 ml und 10,0 ml, auf 18,6 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, zur Anwendung.

Die angewendeten Enzymmengen entsprechen also
1/40 Tabl., 1/10 Tabl., 3/10 Tabl. und 5/10 Tabl.

Durchführung:

7,5 g Substrat, 6,0 ml Puffer und je 4,8 ml Kalziumchlorid-, Albumin- und Natriumoleatlösung werden zu 18,6 ml verdünnter Fermentlösung wechselnden Gehaltes in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen gebracht. Dann wird der Ansatz bei 30 °C mäßig geschüttelt. Nach einer Stunde wird das Verdauungsgemisch mit 125 ml Äthanol und 20 ml Äther quantitativ in einen größeren Kolben übergeführt (Unterbrechung der Hydrolyse). Nach Zugabe von 12 Tropfen Indikatorlösung erfolgt die Titration mit KOH bis zu bleibendem blauem Farbton.

Ermittlung des Leerwertes:

Die Ermittlung der Leerwerte erfolgt für jede Analysenprobe in der Weise, daß der Alkaliverbrauch eines Versuchsansatzes ohne Substrat in entsprechender Weise bestimmt wird.
(Das Substrat allein ergibt keinen Verbrauch an KOH.)

Auswertung der Ergebnisse:

Die prozentuale Fettspaltung, bezogen auf die vorgelegte Substratmenge, wird nach Abzug des Leerwertes mit der Formel

$$\text{Fettspaltung (\%)} = \frac{A \cdot 100}{E \cdot V} \quad \text{berechnet.}$$

A: Alkaliäquivalent der freigesetzten Fettsäuren in mg

E: Substrateinwaage in g

V: Verseifungszahl des Substrates in mg KOH/g Ester

2.2.2) Bestimmung des Lipasegehaltes nach Fiore und Nord (8)

Prinzip:

Das Substrat wird mit Hilfe von Polyvinylalkohol (PVA)-Lösung emulgiert und der Verdauung durch das Enzympräparat unterworfen; die freigesetzten Fettsäuren werden mit Natronlauge alkalimetrisch erfaßt.

Reagentien:

Olivöl, Verseifungszahl 190,77 (Olio Sasso: Sasso & Figli, Oneglia, Italien).

Polyvinylalkohol W 25/140 in 1 %iger wäßriger Lösung ⁺,

Puffer nach Mc Illoaine, pH-Wert = 8,0; hergestellt aus 0,1 m-Zitronensäure (2,8 ml) und 0,2 m- Na_2HPO_4 (97,2 ml).

Enzym: 2 Tabletten eines Präparates mit Seesand fein zerrieben und mit 100 ml Aqua dest. aufgeschwemmt. Hiervon kommen pro Ansatz 5,0; 2,0; und 0,5 ml zur Anwendung, was einer Fermentmenge von 1/10 Tabl., 4/100 Tabl. und 1/100 Tabl. pro Ansatz entspricht.

Aethylalkohol (96 %) - Azeton - Gemisch 1:1,
1 %ige aethylalkoholische Phenolphthaleinlösung,
0,05 n-NaOH (Merck).

Emulgierung des Substrates

Zur Herstellung einer 1 %igen PVA-Lösung wird der Alkohol langsam und in guter Verteilung in 1/20 des Endvolumens eiskalten Wassers (unter 3 °C) gebracht. Nach mehrstündiger Quellung erfolgt durch Nachgeben kleinerer Wassermengen Verdünnung der Lösung auf die vorgesehene Konzentration.

45 ml der 1 %igen PVA-Lösung werden mit 4,42 g Öl versetzt (Konzentration = 0,1 molar, Olivöl als reines Triolein angenommen) und 3 min in einem Homogenisator (Firma E. Bühler, Tübingen) emulgiert.

Ausführung der Analyse

In einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen werden

*) Fiore und Nord geben für den von ihnen benutzten PVA eine mittlere Viskosität, Typ B, an. Dieser PVA entspricht dem Elvanol, der 52 bis 22 Polymerisations-

10 ml frisch bereitete Substratemulsion,

5 ml Puffer und

abgestufte Mengen Enzymlösung gebracht.

Die Mischung wird unter mäßigem Schütteln eine bzw. vier Stunden bei 38° C gehalten. Der Verdauungsvorgang wird durch Zugabe von 30 ml Äthylalkohol-Azeton-Lösung unterbrochen. Es folgt Zugabe des Indikators und Titration.

Leerwertbestimmung

Zur Bestimmung des Leerwertes wird der Laugenverbrauch von Substratemulsion und Puffer und - getrennt hiervon - von 10 ml jeder Enzymaufschwemmung, ermittelt. Nach Umrechnung des Verbrauchs der Enzymlösung auf das angewandte Volumen und Addition der Zwischenergebnisse ergibt sich der Gesamtleerwert.

3) Ergebnisse

Die Untersuchungen der Präparate mit den oben beschriebenen Methoden erbrachten folgende Ergebnisse:

3.1) Ergebnisse der Bestimmung nach Willstätter und Mitarbeiter

Aus Tabelle I und den Abbildungen 1 - 4 geht hervor, daß die Präparate:

- a) Pankreon Drag., Pankreon Tabl., Pankreatin, Festal, Panzynorm, Combizym, Bilicombin, Pancurmen, Gedohepar, Panpeptal und Pankro-digest mit fallender Wirksamkeit in dem von Willstätter geforderten Spaltungsbereich von 10 bis 25 % liegen;
- b) Pantozyme, Euflat, Intestinol, Arbuz, Intestiflor, Eupept, Fermocyl, Pankreasmellin, Pankrazym und Okipan diesen Spaltungsbereich nicht erreichten und
- c) in Encymapain, Encymo-Drageletten, Encym-Grandelat, Enzynorm, Florohormon, Hevizym, Idoferm, Okizym und Purgocit keine Lipase-aktivität festgestellt werden konnte [†]).

[†]) Mehrere dieser Präparate sollen pflanzliche Lipase enthalten, deren pH-Wirkungsoptimum in einem anderen Bereich als dem von uns gewählt liegt. - Wir führten die Untersuchungen mit Rücksicht auf die im Dünndarm vorliegenden Verhältnisse, jedoch nur in dem für tierische Lipase optimalen Wirkungsbereich durch.

3.2) Ergebnisse der Bestimmung von Fiore und Nord

Wie aus Tabelle II und Abbildung 5 ersichtlich, wurde bei 1stündiger Ver-
dauungszeit in der Reihenfolge:

Pankreon Drag., Pankreatin, Pankreon Tabl., Festal, Panzynom, Combizym, Bilicombin, Gedohepar, Pancurmen, Panpeptal, Pankrodigest, Pantozyne, Euflat, Intestinol, Eupept, Intestiflor und Fermocyl abfallende Lipaseaktivität festgestellt.

Keine fettsplattende Wirkung war in:

Arbuz, Dymal, Encymapain, Enzym-Grandelat, Enzymo-Drageletten, Enzynorm, Florohormon, Hevizym, Idoferm, Okipan, Okizym, Pankrazym, Pankreasmellin, Purgocit, nachzuweisen.

Nach 4stündiger Verdauungszeit lautete die Reihenfolge der lipaseaktiven
Präparate:

Pankreon Drag., Pankreatin, Pankreon Tabl., Festal, Panzynom, Combizym, Bilicombin, Pancurmen, Gedohepar, Panpeptal, Pankrodigest, Pantozyne, Euflat, Intestinol, Arbuz, Intestiflor, Eupept, Fermocyl, Pankreasmellin, Pankrazym, Okipan und Dymal.

In:

Encymapain, Enzym-Grandelat, Enzymo-Drageletten, Enzynorm, Floro-
hormon, Hevizym, Idoferm, Okizym, und Purgocit wurde keine Lipase
festgestellt.

Tabelle I

Prozentuale Spaltung (Ordinate) von 7,5 g Olivenöl durch abgestufte
Mengen Enzym (Abszisse) bei einstündiger Verdauung

Präparat	Enzymmenge in Tablettenbruchteilen			
	5/10	3/10	1/10	1/40
Arbuz	5,48	5,48	1,56	0,78
Bilicombin	16,07	9,99	7,64	3,92
Combizym	17,64	15,09	5,48	1,56
Euflat	8,91	6,46	3,20	1,47
Eupept	4,31	2,94	1,56	0,39
Fermocyl	3,72	1,56	0,58	-
Festal	22,31	18,35	12,62	9,02
Gedohepar	12,15	9,21	3,33	0,98
Intestiflor	4,60	3,82	1,17	0,58
Intestinol	8,87	7,19	2,36	1,56
Okipan	0,19	-	-	-
Pankrazym N	1,76	1,17	0,39	-
Pancurmen	15,48	10,87	8,62	2,35
Pankreasmellin	1,96	1,76	0,58	-
Pankreatin	23,52	18,69	10,36	7,84
Pankreon Drag.	26,26	21,56	10,89	5,51
Pankreon Tabl.	24,69	19,90	14,40	6,12
Pankrodigest	10,49	7,12	4,15	3,17
Panpeptal	10,78	8,23	6,56	1,47
Pantozyme	9,01	6,66	5,48	0,98
Panzynorm	19,60	14,89	10,87	1,76

Nekrosolva

Enzymmenge:	4,0 g	2,0 g	1,0 g
prozentuale Fettspaltung	0,78	0,98	0,39

Pyosolva

Enzymmenge	6,0 ml	2,0 ml	1,0 ml	0,5 ml
prozentuale Fettspaltung	9,80	11,17	7,84	4,5

Vermizym

Enzymmenge in Tabl. bruchteilen	5/10	3/10	1/10
Fettspaltung (%)	1,56	1,17	0,58

Nematolyt Grau

Enzymmenge i. Beutelbruchteil.	1/6	1/10	1/30	1/120
	2,25	1,96	0,98	0,78

% Spaltung



Abb. 1 Wirkung verschiedener Permentpräparate auf 7,5 gr. Olivenöl bei 1stündiger Verdauung.
(Siehe auch Tab. I)

% Spaltung



Wirkung verschiedener Fermentpräparate auf 7,5gr.
Olivenöl bei 1stündiger Verdauung.

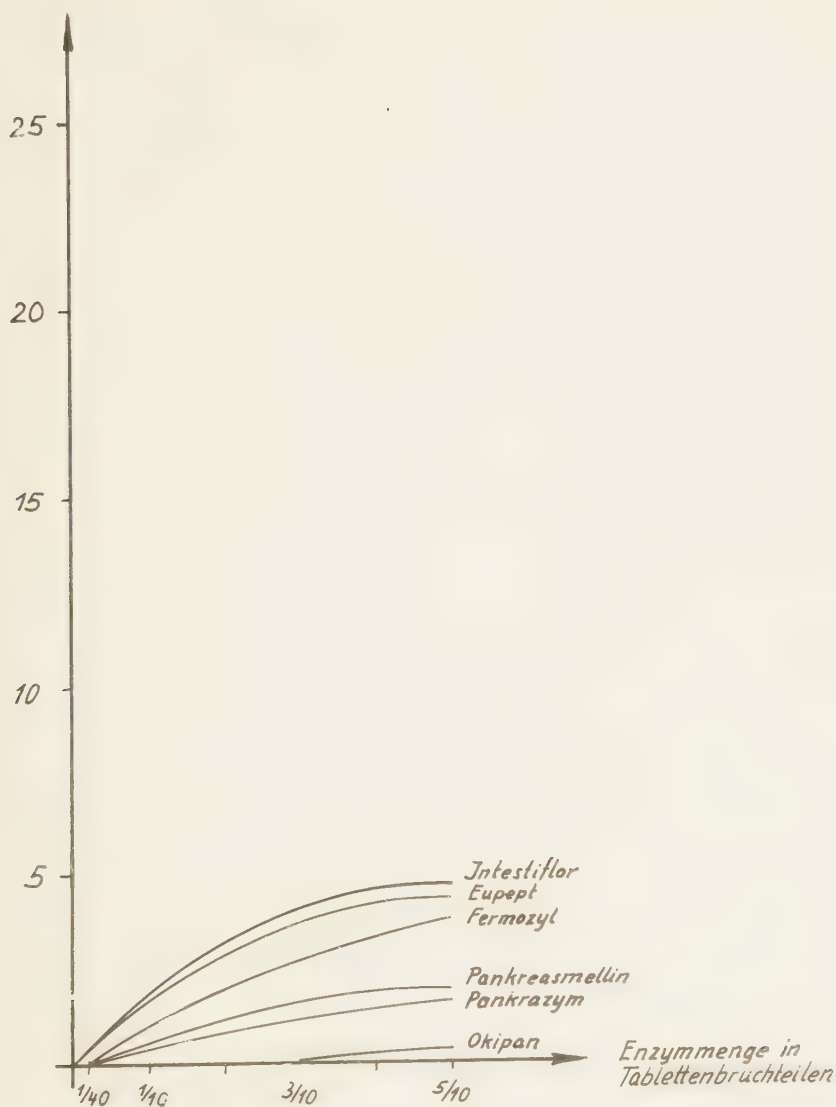
(Siehe auch Tab. I)

Abb. 2



Abb. 3 Wirkung verschiedener Fermentpräparate auf 7,5 gr. Olivenöl bei 1 stündiger Verdauung.
(Siehe auch Tab. I)

% Spaltung



Wirkung verschiedener Fermentpräparate auf 7,5gr
Oliveöl bei 1stündiger Verdauung.
(Siehe auch Tab. I)

Abb. 4

Tabelle II

Zur Titration der freigesetzten Fettsäure verbrauchte 0,05 n-NaOH

in ml

	1 Std. Verd. Zeit			4 Std. Verd. Zeit			Leerwerte		
Enzymmenge in	1/10	4/100	1/100	1/10	4/100	1/100	1/10	4/100	1/100
Tabletten- bruchteilen									
Arbuz	-	-	-	3,58	1,28	-	1,55	1,50	1,47
Bilicombin	2,13	1,54	-	6,49	4,70	0,82	1,63	1,53	1,49
Combizym	3,24	1,46	-	6,62	4,46	1,67	1,72	1,57	1,49
Dymal	-	-	-	0,46	-	-	1,73	1,57	1,49
Euflat	1,12	0,40	-	3,99	1,29	-	1,61	1,52	1,48
Eupept	0,96	-	-	3,10	1,59	-	1,77	1,59	1,49
Fermocyl	0,26	-	-	2,71	1,01	-	1,69	1,55	1,49
Festal	4,57	4,14	1,64	8,58	7,23	4,12	1,69	1,56	1,49
Gedohepar	2,04	1,02	-	5,61	4,00	0,97	1,63	1,53	1,48
Intestiflor	0,88	-	-	3,20	0,33	0,15	1,60	1,52	1,48
Intestinol	0,98	-	-	3,96	1,14	-	1,64	1,60	1,48
Okipan	-	-	-	0,66	0,28	-	1,60	1,53	1,47
Pancurmen	1,87	0,94	-	6,22	4,12	0,53	1,57	1,50	1,47
Pankrazym	-	-	-	1,26	0,28	-	1,75	1,48	1,47
Pankreasmellin	0,20	-	-	2,11	0,58	-	1,66	1,60	1,50
Pankreatin	5,05	3,79	1,95	9,59	8,10	6,31	1,88	1,63	1,51
Pankreon Dr.	5,41	4,66	2,16	10,74	7,92	6,32	1,80	1,60	1,50
Pankreon Tbl.	4,73	3,62	1,39	8,63	8,29	3,94	1,82	1,61	1,50
Pankrodigest	1,79	1,40	-	4,62	2,39	0,92	1,99	1,68	1,52
Panpeptal	1,82	1,07	-	4,69	3,28	0,38	1,59	1,51	1,48
Pantozyme	1,54	0,50	-	4,5	2,84	0,37	2,15	1,74	1,53
Panzynorm	3,76	2,64	0,62	7,27	4,57	0,20	1,93	1,65	1,51
Vermizym	-	-	-	0,30	-	-	1,80	1,60	1,50
Pyosolva									
Enzymmenge (ml)	1,0	0,5	0,25	1,0	0,5	0,25	1,0	0,5	0,25
verbr. Lauge	2,79	1,34	0,72	6,99	4,93	3,48	2,17	1,82	1,64
Nekrosolva									
Enzymmenge (g)	2,0	1,0	2,5	2,0	1,0	0,4	2,0	1,0	0,4
verbr. Lauge	0,92	-	-	1,78	0,94	-	1,82	1,64	1,54

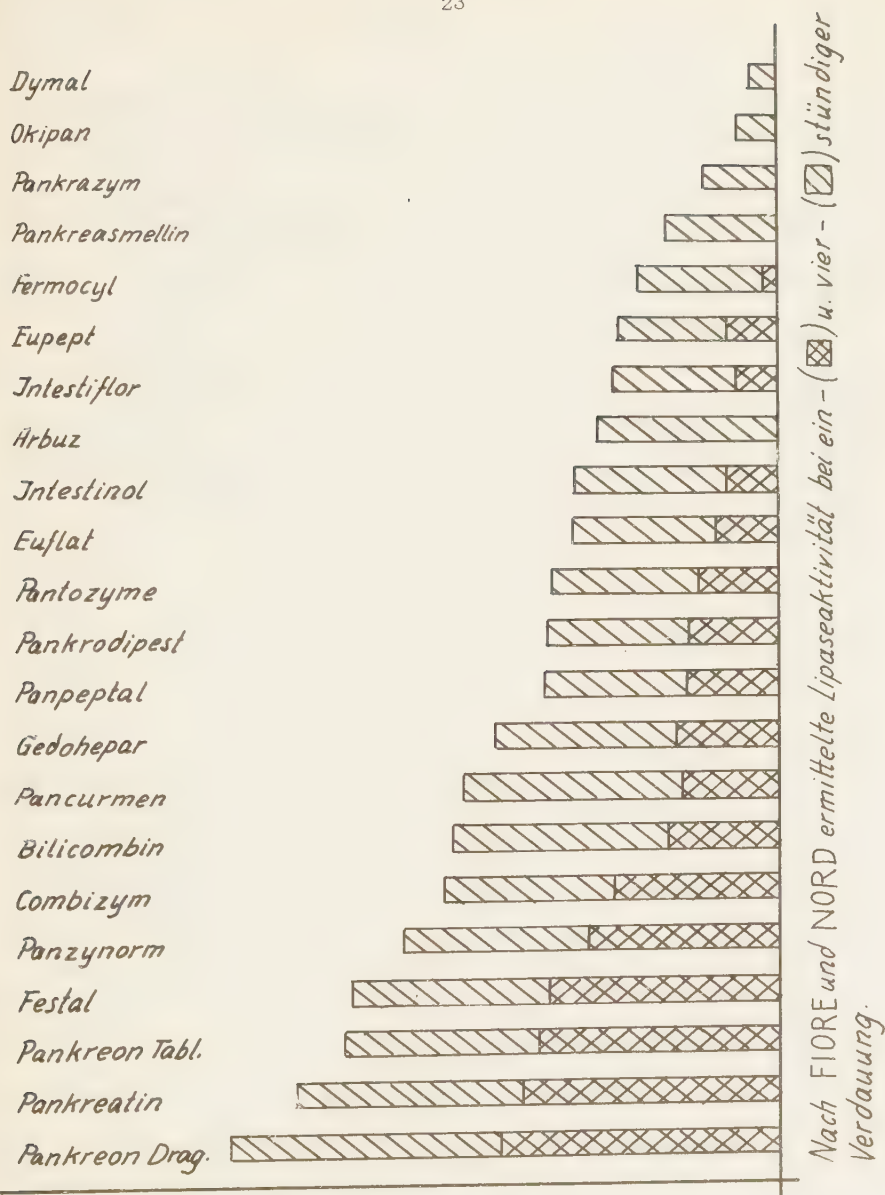


Abb. 5

Nach FIORE und NORD ermitteltes
Fettsäureäquivalent in ml 0,05N-NaOH
(Siehe auch Tab. II.)

Ergebnisse der Untersuchungen von Präparaten, die nicht der Pankreas-substitution dienen

Interessenthalber wurden auch einige Präparate, die der Behandlung schlecht heilender Wunden dienen, auf ihre Lipasewirksamkeit untersucht.

Im Acrustin wurde kein Fettspaltungsvermögen gefunden.

Nekrosolva:

Nach Willstätter wurden mit 4 g, 2 g und 1 g Substanz Fettsäuren abgespalten. Die prozentuale Spaltung ist aus Tabelle I ersichtlich.

In der Bestimmung von Fiore wurden 2 g, 1 g und $\frac{2}{5}$ g vorgelegt. Bei einstündiger Verdauungszeit wurde mit 2 g des Präparates Fettspaltung festgestellt; in 4 Stunden auch mit 1 g. $\frac{2}{5}$ g bewirkten keine Spaltung. (Tabelle II)

Pyosolva:

Nach Willstätter wurde Lipaseaktivität mit:

6 ml, 2 ml, 1 ml und 0,5 ml Pyosolva-Reinlösung festgestellt. (Tabelle I)

Nach Fiore wurden mit 1 ml, 0,5 ml und 0,25 ml bei ein- und bei vierstündiger Verdauungszeit Fettsäuren abgespalten.

Die fettspaltende Wirkung dieser Präparate kann bei der Auflösung nekrotisierenden Gewebes von Bedeutung sein. Überdies wirken möglicherweise die abgespaltenen Fettsäuren aktivierend durch Entzündungssteigerung. Dazu ist zu bemerken, daß auch die Leukozyten eine Lipaseaktivität besitzen (9).

Schließlich kamen noch 2 Fermentpräparate zur Untersuchung, die vermicid durch Keratinolyse wirken sollen. Vermicym und Nematolyt wurden nach der Methode von Willstätter geprüft und zeigten beide Fettspaltungsvermögen.

4.1) Besprechung der Ergebnisse

a) der Willstätter Methode

Zum Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Untersucher liegen uns drei Arbeiten vor:

Vinazzar (25) bestimmte die fettspaltende Wirkung von 7 Präparaten des

Handels nach der Methode von Cherry und Crandall modifiziert von Preibisch (16). Hiervon sind vier unter den von uns untersuchten. Für diese gibt Vinazzer die gleiche Reihenfolge der Wirksamkeit an, wie wir sie fanden:

Pankreon, Festal, Panpeptal und Pankrodigest.

Balzer und Werner (3) bestimmten mit der Willstätter Methode die Schwankungsbreite der Lipasewirkung bei sieben Präparaten, die auch wir untersuchten. Die Reihenfolge der Wirksamkeit stimmt nur bei drei Präparaten mit der unsrigen überein.

Die gleichen Untersucher stellten in einer späteren Arbeit (4) interessanterweise eine andere Reihenfolge der Wirksamkeit fest, die in 5 von 10 Fällen mit der unsrigen zusammenfällt.

b) der Methode von Fiore und Nord:

Die Methode von Fiore und Nord erbrachte - bis auf wenige Ausnahmen - dieselbe Reihenfolge der Wirksamkeit der Präparate, wie die Willstätter-Methode.

Bei einstündiger Verdauungszeit und der kleinsten vorgelegten Fermentmenge von 1/100 Tabl. stellten wir noch in Pankreon Drag., Pankreatin, Pankreon Tabl., Festal und Panzynom Spaltungsvermögen fest. Diese Präparate zeigen auch bei der Methode nach Willstätter die größte Aktivität. Pankreatin rangiert vor Pankreon Tabl.; bei Willstätter ist es umgekehrt. In diesem Zusammenhang sind Befunde von Balzer und Werner (3) interessant, die gerade bei Pankreatin auf große Schwankungen hinsichtlich der Wirksamkeit hinweisen. Bei Anwendung von 1/10 Tabl. stimmt die Reihenfolge der Wirksamkeit bis auf 3 von 18 Präparaten mit der nach der Methode von Willstätter ermittelten überein. Unter ihnen ist wieder das Pankreatin, sowie Pancurmen, die - nach Fiore untersucht - bessere bzw. schlechtere Fettspaltung zeigten als bei der Methode nach Willstätter. Keine Wirksamkeit war bei Arbuz nachzuweisen.

Nach vier Stunden Verdauungszeit unterscheiden sich die Ergebnisse beider Methoden nur noch bei Pankreatin.

In dieser langen Zeit vermögen die weniger guten Präparate gegenüber den guten aufzuholen, da bei den guten rasch große Mengen Spaltprodukte entstehen, die ihre Wirksamkeit in vitro bei längerer Verdauungszeit beeinträchtigen, ein Vorgang, der wegen der laufenden Resorption der Spaltprodukte

in vivo keine Parallele hat.

4. 2) Besprechung der Methoden

Willstätter geht bei der Ermittlung der Lipasewirkung von Gewichtsmen-gen der jeweiligen Pankreasdrüsensubstanz aus. Das ist bei der Untersuchung von Fermentpräparaten, wie Vinazzer (25) feststellt, nicht möglich, da diese neben Pancreatin verschiedene Zusätze enthalten, und oft dragiert sind (ganz abgesehen davon, daß exakte Angaben über die Menge der Pankreasdrüsensubstanz bei Handelspräparaten oft fehlen). Aus diesem Grunde legten wir in unseren Untersuchungen Enzymmengen vor, die in Tablettenbruchteilen enthalten waren.

Den von Vogel und Laeverenz (26) angegebenen Versuchsansatz verdreifachten wir zur Erzielung größerer Genauigkeit.

Hinsichtlich der Leerwertbestimmungen erwies sich für unsere Untersuchungen eine Änderung als notwendig, da bei der Bestimmung nach Willstätter nicht berücksichtigt wird, daß die in den Präparaten gleichzeitig enthaltenen Proteasen das (als Aktivator zugegebene) Eialbumin verdauen und somit zu einer Säuerung führen, die den KOH-Verbrauch beeinflusst. Deshalb und wegen des unterschiedlichen Proteasengehaltes in den Präparaten wurde für jede Analyse eine eigene Leerwertbestimmung erforderlich.

Fiore und Nord verwendeten bei der Bestimmung pflanzlicher Lipase einen Puffer von pH 7,0. Für unsere Untersuchungen mit tierischer Lipase wählten wir denselben Puffer mit einem pH-Wert von 8,0, der in vergleichbaren Untersuchungen auch von Balzer und Werner (2) als optimal (besser als der von Willstätter verwendete) befunden wurde.

Beim Vergleich der Methoden kann als Vorteil der Willstätter Methode die große Substratmenge bezeichnet werden, die auch die Erkennung kleiner Fermentmengen bzw. weniger wirksamer Präparate ermöglicht. Als günstig darf auch die gute Aktivierung des Enzyms bewertet werden.

An Nachteilen der Willstätter Methode müssen erwähnt werden:

1. Rein arbeitsmäßig: Verwendung von 3 Aktivatoren gegenüber einem bei Fiore.
2. Die weniger gute Emulgierung des Substrates,
3. die vermehrt erforderlichen Leerwertbestimmungen,
4. eine schlechte Erkennung des Titrationsendpunktes (da die abgespaltenen

Fettsäuren von der als Aktivator zugegebenen Albuminlösung umhüllt werden),

5. eine weniger gute Reproduzierbarkeit als bei Fiore und Nord.

Die Methode von Fiore scheint uns jener von Willstätter in keinem Punkt unterlegen zu sein, während ihre Vorteile bereits als Nachteile der Willstätter-Methode Erwähnung fanden.

5) Zusammenfassung

a) Im Rahmen vergleichender Fermentbestimmungen wurden folgende Fermentpräparate des Handels auf ihre Lipaseaktivität untersucht:

Arbuz, Bilicombin, Combizym, Dymal, Encymapain, Enzym-Grandelat, Enzymo-Drageletten, Enzynorm, Euflat, Eupept, Fermocyl, Festal, Florohormon, Gedohepar, Hevizym, Idoform, Intestiflor, Intestinol, Okipan, Okizym, Pankrazym N, Pancurmen, Pankreasmellin-Neu, Pankreatin, Pankreon Tabl., Pankreon Drag., Pankrodigest, Panpeptal, Pantozyne, Panzynorm, Purgocit, Nematolyt, Vermizym, Acrustin, Nekrosolva, Pyosolva.

Die Bestimmung erfolgte mit der klassischen Methode von Willstätter und einer neueren von Fiore und Nord.

b) Die Willstätter-Methode ergab eine in der nachstehenden Reihenfolge abnehmende Lipaseaktivität:

Pankreon Drag., Pankreon Tabl., Pankreatin, Festal, Panzynorm, Combizym, Bilicombin, Pancurmen, Gedohepar, Panpeptal, Pankrodigest, Pantozyne, Euflat, Intestinol, Arbuz, Intestiflor, Eupept, Fermocyl, Pankreasmellin, Pankrazym, Okipan.

In Encymapain, Enzym-Grandelat, Enzymo-Drageletten, Enzynorm, Florohormon, Hevizym, Idoform, Okizym und Purgocit wurde keine Lipase festgestellt.

c) Nach Fiore und Nord wurde bei einstündiger Verdauungszeit die Reihenfolge

Pankreon Drag., Pankreatin, Pankreon Tabl., Festal, Panzynorm, Combizym, Bilicombin, Gedohepar, Pancurmen, Panpeptal, Pankrodigest, Pantozyne, Euflat, Intestinol, Eupept, Intestiflor und Fermocyl ermittelt, während in

Arbuz, Dymal, Encymapain, Enzym-Grandelat, Enzymo-Drageletten, Enzynorm, Florohormon, Hevizym, Idoferm, Okipan, Okizym, Pankrazym, Pankreasmellin und Purgocit keine fettspaltende Wirkung festgestellt wurde.

Nach 4 Stunden Verdauungszeit lautete die Reihenfolge:

Pankreon Drag., Pankreatin, Pankreon Tabl., Festal, Panzynorm, Combizym, Bilicombin, Pancurmen, Gedohepar, Panpeptal, Pankrodigest, Pantozyne, Euflat, Intestinol, Arbuz, Intestiflor, Eupept, Fermocyl, Pankreasmellin, Pankrazym, Okipan und Dymal.

Bei vierstündiger Verdauungszeit wurde in:

Encymapain, Enzym-Grandelat, Enzymo-Drageletten, Enzynorm, Florohormon, Hevizym, Idoferm, Okizym und Purgocit keine Lipase festgestellt.

Die Reihenfolge der wirksamen Präparate stimmt bis auf das Pankreatin bei beiden Methoden überein.

d) Die Methode von Fiore und Nord hat sich als brauchbar für die Bestimmung der Lipaseaktivität in Handelspräparaten erwiesen und scheint in mancher Hinsicht jener von Willstätter überlegen zu sein.

Literatur

- 1) Balls, A. K. und J. W. Tucker
J. biol. Chem. 122, 125 (1937)
- 2) Balzer, E. und K. Werner
Ztschr. f. klin. Med. 150, 523 (1953)
- 3) Balzer, E. und K. Werner
Med. Klin. 1036 (1953)
- 4) Balzer, E. und K. Werner
Münch. med. Wschr. 47, 1386 (1954)
- 5) Baman, E. und P. Laeverenz
Ztschr. f. physiol. Chem. 223, 1 (1933)
- 6) Baman, E. und K. Myrbäck
"Die Methoden der Fermentforschung"
Handb. Leipzig, Bd. 2, 1549 (1941)
- 7) Bier, M.
"Methods in Encymology"
Handb. von S. P. Colowick und N. O. Kaplan
- 8) Fiore, J. V. und F. F. Nord
Arch. of Biochem. Vol. 23, Nr. 3, 473 (1949)
- 9) Flaschenträger, B. und E. Lehnartz
"Physiologische Chemie"
Handb. Springer-Berlin, 1070 (1954)
- 10) Glick, D. und C. G. King
Amer. Soc. 55, 2445 (1933)
- 11) Glick, D.
Ztschr. f. physiol. Chem. 223, 252 (1934)
- 12) Kraut, H. F. und W. v. Pantschenko-Jurewicz
Biochem. Ztschr. 275, 114 (1935)
- 13) Lehnartz, E.
Lehrbuch Berlin-Springer 243 (1949)
- 14) Nachlas, N. M. und A. M. Seligmann
J. Biol. Chem. 181, 343 (1949)

- 15) Nord, F.F. und v. Ranke, O. M.
Chem. Ber. 65, 1153 (1932)
- 16) Preibisch, W. Inaug. Diss. Bern 1953
- 17) Rona, P. und H. Kleinmann
Biochem. Ztschr. 174, 18 (1926)
- 18) Rona, P. und A. Lasnitzky
Biochem. Ztschr. 241, 316 (1931)
- 19) Rona, P. und R. Ammon
Biochem. Ztschr. 249, 446 (1932)
- 20) Seligman, A. M. und M. N. Nachlas
J. clin. investigation 29, 31 (1950) Lancaster
- 21) Sumner, J. B. und Somers, G. F.
"Chemistry and Methods of Enzymes"
Academic press N. Y. 80 (1953)
- 22) Sumner, J. B. und Somers, G. F.
Labor. Exper. in Biol. Chem.
Academic press N. Y. (1944)
- 23) Toyoki, O. J. agric. chem. Soc. Jap. 16, 14 (1940)
- 24) Umschweif, B. Biochem. Ztschr. 249, 75 (1932)
- 25) Vinazzer, H. Wiener Med. Wschr. 33/34, 616 (1953)
- 26) Vogel, L. und P. Laeverenz
Ztschr. f. physiol. Chem. 234, 176 (1935)
- 27) Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz und F. Memmen
Ztschr. f. physiol. Chem. 125, 93 (1923)
- 28) Willstätter, R. und F. Memmen
Ztschr. f. physiol. Chem. 129, 1 (1923)
- 29) Willstätter, R. und F. Memmen
Ztschr. f. physiol. Chem. 133, 229 (1924)
- 30) Willstätter, R. "Untersuchungen über Enzyme"
Handb. Berlin 1928, 2, 1153

- 31) Yamamoto, T. J. of Biochem. 38, 147 (1951)

Abschließend danke ich Herrn Professor
Dr. K. Zipf für die Überlassung des Themas
und die Möglichkeit, die Untersuchungen
in seinem Institut durchzuführen.

Den Herren Dr. A. Schmid und Dr. W. Schlemmer
danke ich für die erteilten Ratschläge.

Lebenslauf

Am 29.8.1931 wurde ich als Tochter des Dr. med. Ernst von Philipsborn und seiner Frau Dr. med. Anna geb. Schweisgut, in Oberstdorf im Allgäu geboren. Von 1938 bis 1942 besuchte ich die Oberrealschule in Oberstdorf, in der ich 1950 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer 1952 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Tierheilkunde. Im 6. und 7. Semester studierte ich an der Tierärztlichen Hochschule von Hannover. Im Juli 1957 legte ich in München das Staatsexamen ab.

